

كلية الصيدلة
السنة الثالثة
2024-2025



الكيمياء الحيوية 2
القسم العملي

مدرس المقرر:
د. روان دياب

المحاضرة
(1-7)





مقدمة عن مخبر الكيمياء الحيوية

نطبق في مخبر الكيمياء الحيوية الطرائق الكيميائية الحيوية لدراسة مرض ما وتشخيصه أواستجابته للعلاج ...

يشمل العمل في المخبر الكيمياء الحيوية معرفة كيفية التعامل مع العينات، الأجهزة، النتائج.

العينات Samples:

عينة الدم (المصل Serum، البلازما Plasma، الدم الكلي Whole blood)، البول Urine، السائل الدماغي الشوكي CSF، سائل الجنب، السائل الأمنيوسي، سائل الحبن، السائل الزليلي المفصلي، السائل المنوي ......

الأجهزة والأدوات:

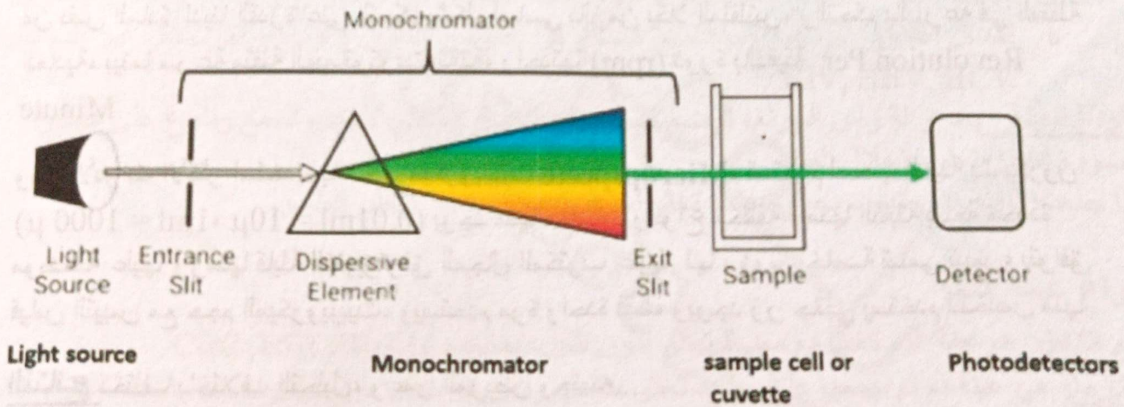
تتواجد العديد من الأجهزة أهمها: مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer، المثقلة Centrifuge، الحمام المائي، المجهر، جهاز PCR، Micropipettes ..... التجهيزات المخبرية مثل أنابيب جمع الدم بأنواعها والسرنغات، الرؤوس المستخدمة مع المصاصات الميكروية، حامل الأنابيب...

كواشف التحاليل الكيميائية تصنع وتأتي جاهزة بعبوة خاصة تسمى كيت KIT، تحتوي هذه الكواشف جميع ما يحتاجه التحليل مرفقة مع نشرة تتضمن الإجراءات اللازمة للقيام بالتحليل بما في ذلك شروط العينة والحفظ وغيرها ......

1 - Spectrophotometer

يقوم على مبدأ امتصاص المادة للضوء بطول موجه معين، إن الضوء الممتص يتناسب طردا مع تركيز المادة، ومع شدة اللون.

المكونات الأساسية للجهاز:



- مصدر الضوء: يصدر الضوء ضمن الأطوال الموجية 200-800 nm .
- موحد الضوء: لعزل طول الموجة المرغوب بها من الضوء واستبعاد أطوال الموجات الأخرى.
- الكوفيت : لوضع المحلول المراد قياس كثافته الضوئية (بلانك، عياري، العينة)
- القارئ : تظهر عليه النتيجة بشكل رقم.

المحاليل والكواشف للقياس

- ✓ العينة Sample (Test): مصل أو بلازما أو غيرها من السوائل البيولوجية والتي نبحث عن تركيز مادة مجهولة فيها مثل السكر أو غيره حيث تضاف لها الكواشف العمل وتمر بنفس خطوات القياس.
- ✓ العياري Standard: محلول يحوي تركيز معلوم من مادة مشابهة للمادة المجهولة المراد معرفة تركيز ها مثلا السكر.
- ✓ الناصع (Blank، Reagent ، شاهد، كاشف) الغاية منه تعويض الألوان غير النوعية الموجودة في كواشف العمل ويتم تصفير الجهاز عليه ، كوفيت البلانك لاتحوي العياري أو العينة.

تطبيق قانون بيير-لامبرت لحساب تركيز مادة ما حسب الامتصاصية: $A = K \times C \times L$

L طول المسار للضوء ضمن الكوفيت وهو موحد بين العينات ١سم.

K ثابت له علاقة بنوع المادة المدروسة وهو موحد بين العينات. امتصاص الضوء من قبل المحلول ما يتناسب طردا مع تركيز هذه المادة في المحلول والعلاقة بينهما خطية. ننسب قيم امتصاص العينة إلى العياري (مع اختزال L,K لأنهما متماثلان بين العينة والعياري) كتالي:

$$A\ sample / A\ standard = C\ sample / C\ standard$$

المجهول لدينا فقط هو تركيز العينة لذلك نستطيع حسابه كالتالي:

$$C\ sample = (A\ sample \times C\ standard) / A\ standard$$

2 – Centrifuge:

جهاز فصل العينات، مبدأ عمله يعتمد على قوة الطرد المركزي، لدينا بشكل أساسي نوعان مثقلة الهيماتوكريت، مثقلة الأنابيب العادية، بأحجام وسعات مختلفة ....
شرط العمل بها تحقيق التوازن، بحيث توضع الأنابيب متقابلة وتحوي نفس الحجم من العينات، ومصنوعة من نفس المادة. لدينا القدرة على التحكم بشكل أساسي بالزمن بكلا المثقلتين، والتحكم بالسرعة في المثقلة العادية، بينما سرعة مثقلة الهيماتوكريت ثابتة، واحدتها (rpm) دورة بالدقيقة Revolution Per Minute.

ومن الأدوات الأكثر استخدام بالمخبر **ميكروبيبيت Micropipette**، تستخدم لسحب العينة بالميكرون (1000 µ = 1ml، 10µ = 0.01ml) يوجد منها مقاسات وأنواع مختلفة ، منها الثابتة بسعة محددة موضحة عليها ، ومنها قابلة للتغيير وفق المجال المكتوب عليها. لها رؤوس خاصة تسمى تيبس، يتوافق قياس التيبس مع حجم الميكروبيبيت، ويستخدم مرة واحدة فقط، ويوجد زر جانبي يستخدم للتخلص منها.

النتائج تختلف باختلاف التحليل، وعمر المريض وجنسه.....
بشكل عام سوف نوضح ذلك بالتفصيل مع كل تحليل على حدا.

يوجد لدينا العديد من **العينات** يمكن تحليلها بالطرق المختلفة، والعينة الأساسية في مختبرنا هي الدم.

مصادر عينة الدم:

الدم الشرياني: عينة الدم الشرياني عينة صعبة، تأخذ حصراً بالمشفى ومن قبل طبيب، وتستخدم عادة لقياس غازات الدم.

الدم الشعري: يستخدم في فحوصات حديثي الولادة وفي تحديد نسبة الهيماتوكريت، لقياس السكر بأجهزة المنزلية، يؤخذ من رؤوس الأصابع أو شحمة الأذن أو من كعب القدم عند الأطفال دون السنتين.

طريقة أخذ الدم الشعري: ينظف الأصبع بالكحول 70% بصورة جيدة ويترك ليجف، ثم يوخذ بواخذة خاصة تستخدم لمرة واحدة، يسهل سيل الدم دون الضغط على الأصبع وضعه في ماء دافئ أو تدليكه قبل البدء ويمص الدم بواسطة ممصات شعرية خاصة.

الدم الوريدي : أكثر عينة مستخدمة في معظم التحاليل، يبزل الدم من الوريد ، بشكل مفضل وسهل وغير مؤلم من أوردة الحفرة المرفقية. الوريد الوحشي يسمى Cephalic Vein، الوريد الأنسي Basilic Vein، الوريد المرفقي الناصف Median cubital vein.

طريقة أخذ الدم الوريد:

- يكشف الوريد بالجس، يساعد الرباط الضاغط على انتباج الوريد.
- يفضل ألا يربط الرباط الضاغط لأكثر من دقيقة لإمكانية التأثر على بعض المشعرات الحيوية مثل الشوارد.
- بعد ربط الرباط الضاغط وتحديد الوريد الهدف تعقم المنطقة أصولا (من المركز إلى المحيط او تعقيم باتجاه واحد حركة واحدة) بواسطة الكحول.
- تدخل الإبرة بعد التأكد من جاهزيتها من ناحية تثبيت الرأس وحركة المدك السهلة، وتدخل بزاوية 45 ولمسافة معتبرة ، نلاحظ صحة العملية من خلال رؤية قطرة دموية في رأس الإبرة.
- عندها نبدأ بسحب المدك للخلف وبسرعة مناسبة بحيث ليست سريعة تسبب اصطدام الكريات ببعضها وانحلالها وليست بطيئة مزعجة للمريض.
- بعد الانتهاء من العملية يفك الرباط الضاغط أولا
- تسحب الإبرة وتوضع قطنة جافة مكان السحب، نضغط عليها لمدة دقيقتين لمنع حدوث ورم دموي.
- يفضل إغلاق الإبرة بيد واحدة لمنع حادثة وخز الإصبع واحتمال انتقال أمراض تنتقل عبر الدم مثل: HIV, HBV, HCV

إفراغ العينة : بعد إزالة رأس السرنغ، توضع فتحته على الجدار الداخلي لأنبوب الجمع وتفرغ على الجدار بصورة لطيفة لتجنب انحلال العينة.

إذا جمعت العينة على أنبوب يحوي مضاد تخثر نمزج الدم مع مضاد التخثر بلطف

أنواع عينة الدم:

الدم الكامل: هو عينة الدم كامل مع مضاد تخثر بدون تثفيل، يستخدم CBC ,ESR ,HbA1c

البلازما: هي عينة دم تم جمعها على مضاد تخثر مناسب وتحريكة بشكل جيد، ثم تم فصلها بالمثفلة الجزء الطافي هو البلازما.

المصل أوسيروم: هي عينة دم تم جمعها على أنبوب جاف (لايحوي مضاد تخثر) تترك حوالي نص ساعة بدرجة حرارة 37°c ثم نحرر العلقة عن جدران الأنبوب الداخلية ويثفل الدم، السائل الطافي هو المصل.

Plasma	Serum
سحب الدم على مضاد تخثر مناسب	سحب الدم على أنبوب جاف (بلا مضاد تخثر)
عينة حاوية بروتينات التخثر المختلفة	عينة خالية من الفيبرينوجين
تتكون من ٣طبقات البلازما،الصفائح والكريات البيض، الكريات الحمراء	تتكون من طبقين الجلطة، المصل

لون المصل والبلازما أصفر باهت.
في حال كان وردي أو زهري أو أحمر يدل ذلك على انحلال الكريات الحمراء.

أسباب انحلال الدم:

أسباب قبل البزل: نتيجة بعض الأمراض مثل تكور الكريات الحمراء الوراثي، فقر الدم المنجلي، التلاسيميا...
أسباب أثناء البزل: وجود أثر من الماء أو الكحول في المحاقن، سحب الدم بسرعة
أسباب بعد البزل: عدم نزع إبرة السيرنج قبل إفراغ الدم في الأنبوب، ضخ الدم بقوة من السيرنج إلى الأنبوب، وجود آثار من الماء أو الكحول في الأنبوب المخصص لجمع الدم.

حفظ عينات الدم:

إذا لم تجر التحاليل مباشرة يجب أن يتم حفظ عينات الدم بشروط ملائمة ريثما يتم العمل عليها.
الدم الكامل: أفضل طريقه لحفظه أخذه على مضاد تخثر (مثل هيبارينات الأمونيوم) وحفظه في درجة 4 ^{o}م.
البلازما والمصل: يمكن حفظهما في درجة حرارة المخبر مدة 4 ساعات دون أن يتبدل تركيبها، أو في درجة 4^{o} م مدة 24 ساعة، وإذا تطلب حفظها مدة أطول وجب تجميد المصل أو البلازما في درجة – 20 ومادون.

أنواع موانع التجلط :Anticoagulants

١- **الهيبارين Heparin:** يقوم الهيبارين بمنع تحول البروترومبين إلى ترومبين وبالتالي يمنع حدوث التخثر عن طريق إعاقة تشكل الفيبرين، يعد أفضل مضاد للتخثر حيث أنه لا يسبب تبدل في تركيب الدم، يستخدم في قياس غازات الدم.
٢- **السترات Citrate**: يستخدم بشكل ملح سترات الصوديوم، وتعتمد آلية عمله على الارتباط مع شوارد الكالسيوم الضرورية لتجلط الدم وبالتالي يمنع عملية التخثر، يستخدم في تحديد سرعة تثفل الدم ESR، وفي تحاليل تخثر الدم PT, PTT ومن الجدير بالذكر أن كمية السيترات المضافة إلى كمية الدم تختلف بيت تلك الاختبارات.
٣- **EDTA(Ethylen Diamin Tetraacetate):** يعمل على الارتباط مع كالسيوم الدم معيقا عملية التخثر، يستخدم الملح ثنائي الصوديوم أو ثنائي البوتاسيوم لحمض الايثيلين ثنائي الأمين رباعي الخل ويفضل الملح البوتاسي لسهولة انحلاله، يستخدم في أغلب الفحوصات الدموية والمناعية وفحص CBC.
٤- **الفلورايد Floride:** يستعمل لكونه مضاد تخثر من جهة، كما أنه يمنع تحلل الغلوكوز الانزيمي من جهة أخرى، ولذلك يستخدم لقياس تركيز الغلوكوز في الدم.
ملاحظة: يختلف نوع مانع التخثر المستخدم حسب التحليل المراد قياسه ...
عند قياس تركيز السكر نستخدم الفلورايد كمانع تخثر لأنه يوقف حلمهة الغلوكوز.
عند تحليل الكالسيوم لا نستخدم EDTA لأنه يرتبط مع الكالسيوم وبالتالي يعطي نتيجة خاطئة سلبيه.

خطر العدوى من عينات الدم:

إن جميع العينات البيولوجية المنشأ تمثل مصدر خطر للعدوى لجميع من يتعامل معها. ويجب اتباع جميع الأشخاص المتواجدين في المخبر قواعد الأمان والحماية من ناحية الحذر واللباس (ارتداء المعطف والقفازات) والنظافة والحصول على اللقاحات المناسبة المتاحة.

الكيمياء الحيوية 2 -القسم العملي
د. منهل طليمات   د. سوسن الخاني

سكر الدم
BLOOD GLUCOSE

السكريات

تتحول السكريات بعد هضمها إلى الغلوكوز الذي يتحول بدوره إلى G6P وهذا الأخير إما أن يعطي الطاقة من تحلل السكر glycolysis أو أن يدخل في تركيب الغليكوجين في الكبد والعضلات و تنتهي في العضوية إلى :

- إنتاج الطاقة وتحولها إلى CO_2 والماء
- تخزن على شكل غليكوجين في الكبد وثلاثيات غليسريد في النسيج الشحمي
- تتحول إلى كيتونات ومنها إلى حموض أمينية وبروتينات.

حيث يحافظ البدن على تركيز الغلوكوز الدموي في حالة الصيام إما من تحلل الغليكوجين Glycogenolysis أو باستحداث الغلوكوز Neo glycogenesis بدءا من البروتينات ويقوم الكبد بالدور الرئيسي في هذه العمليات التي تتدخل فيها عدة هرمونات أهمها الأنسولين وتحت تأثير هذا التنظيم يبقى مستوى الغلوكوز 60 - 110 مغ/د ل .

الهرمونات التي تتدخل في تنظيم السكر الدموي:

- الأنسولين Insulin
- الادرينالين Adrenalin
- هرمون النمو Growth hormone
- الغلوكاغون Glucagon
- الكورتيزول Cortisol

الداء السكري Diabets Mellitus:

هو مثال عن اضطراب استقلاب السكريات الناجم إما عن:

- ✓ خلل في تركيب الأنسولين وإفرازه
- ✓ معاكسة عمل الأنسولين في الأنسجة.

تصنيف الداء السكري :

1) السكري المعتمد على الأنسولين IDD أو Type1 النمط الأول : يدعى بالسكر الشبابي وفيه عوز مطلق للأنسولين بسبب تخرب خلايا بيتا في جزر لانغرهانس في البنكرياس ويصادف في كل الأعمار ويحتاج فيه المرضى للأنسولين طيلة حياتهم

الآلية الإمراضية : تكون وراثية أو بيئية أو فيروسية ومعظم المرضى يملكون أضداد ذاتية موجهة ضد البنكرياس وقد يتواجد لديهم أضداد ضد الأنسولين .

أهم أعراضه : يبدأ بشكل سريع ومن أعراضه الضعف والتعب الشديد, العطش الشديد polyuria , ونقص الوزن وبوال ليلي , النهم للطعام polydipsia

العلاج : يعطى الأنسولين حقنا تحت الجلد أو في الفخذ أو في جدار البطن ..

2) السكري غير المعتمد على الأنسولين NIDD أو النمط الثاني Type2 : يدعى السكري الكهلي لأنه يصادف عند الأشخاص الأكبر من 35 سنة وفيه عوز نسبي للأنسولين ويتعلق هذا النوع بإفراز الأنسولين من خلايا بيتا والمقاومة المحيطية للأنسولين.

من أسباب هذه المقاومة:

- خلل في بنية الأنسولين
- أضداد جوالة ضد الأنسولين وأضداد المستقبلات الأنسولينية
- خلل في النسج التي يعتمد عليها الأنسولين
- زيادة الهرمونات الرافعة للسكر .

تبدأ أعراضه بشكل أخف حدة من النمط الأول حيث يعاني المريض من ضعف في الرؤية واعتلال أعصاب محيطية وتقرح في أصابع القدم وحكة فرجية عند النساء.

المعالجة : خافضات السكر الفموية

3) السكر الحملي (GDM) Gestational diabetes mellitus :

يترافق الحمل بزيادة المقاومة المحيطية للأنسولين خاصة في الثلث الثاني والثالث من الحمل وبعد الولادة إما أن يعود مستوى الغلوكوزيميا إلى السوي أو تبقى المرأة مصابة بداء السكري .

تقصيه عند الحامل : تعطى المرأة الحامل 50 غ غلوكوز ويتم معايرة الغلوكوز في المصل بعد ساعة وعندما يكون تركيزه 140 ملغ \دل أو أكثر يتابع فحص تحمل السكر .

اختلاطات الداء السكري:

- ✓ الغيبوبة السكرية hyperglycemia coma
- ✓ الحماض الكيتوني السكري ketoacidosis
- ✓ اعتلال شبكية العين

✓ اعتلال الكلية

✓ موات القدم بسبب الاعتلال الدوراني والعصبي وتصلب الشرايين الذي يؤدي الى غنغرينا .

✓ يتأخر شفاء الجروح عند مريض السكري لأن ارتفاع السكر يعطل وظيفة وعمل الصفيحات

كيف يتم الكشف عن داء السكري لدى المريض :

تحليل الدم	فحص السكر في البول	فحص الخضاب الغلوكوزي HbA1C
يجري تحليل السكر في الدم ✓ مستوى الغلوكوز الطبيعي الصيامي 60 - 110 مغ/د ل . ✓ مستوى الغلوغوز الطبيعي العشوائي اقل من 200 مع/دل ✓ اختبار تحمل الغلوكوز الفموي OGTT : صيام 8 ساعات ثم يتم قياس مستوى الغلوكوز في البلازما ثم إعطاء 75 غ من الغلوكوز وقياس الغلوكوز بعد ساعتين حيث في الحالة الطبيعية - يكون مستوى الغلوكوز في الدم اقل من 140 مغ/دل - اما في حال كان المستوى 144-199 مغ/دل يكون مؤهب للإصابة بالسكري - وفي حال كان المستوى اعلى من 200 مغ/دل فالشخص مصاب بالسكري	ان ظهور السكر في البول يدل على ان مستواه في الدم 180 مع/دل فما فوق ملاحظة : عدم وجود السكر في البول لاينفي الإصابة بالداء السكري اما وجود السكر في البول فيؤكد الاصابة	يدل على مدى السيطرة على سكر الدم خلال الشهور الثلاثة الماضية - اذا كانت النتيجة اقل او يساوي 6% فهو جيد للشخص الطبيعي - اذا كانت النتيجة 6-7% دل ذلك على مقدمة حدوث داء السكري - اذا كانت النتيجة اكثر من 7% فإن ذلك يدل على ضبط سيء للسكر

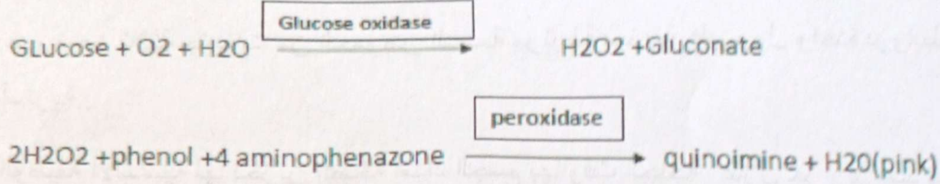
ملاحظة : حسب معايير منظمة الصحة العالمية WHO يعتبر الشخص مصاب بداء السكري في الحالات التالية

- ظهور الاعراض مع ارتفاع السكر الصيامي لمرتين متتاليتين
- ظهور الاعراض مع ارتفاع السكر العشوائي لمرتين متتاليتن
- ارتفاع السكر الصيامي مرتين متتاليتين مع ارتفاع السكر العشوائي مرتين متتالين
- اختبار تحمل الغلوكوز مرتفع (لوحده يكفي)

القسم العملي :

- مبدأ تحليل السكر الدموي :

العينة المطلوبة : مصل – بلازما



شدة اللون تتناسب مع تركيز الغلوكوز في العينة

- ✓ طول الموجة : 500 nm
- ✓ تركيز العياري : 100mg/dl.

طريقة العمل :

- ✓ تصفر الجهاز باستخدام البلانك .
- ✓ نحضر ثلاث انابيب(البلانك- العياري- العينة) يحوي المقادير المطلوبة من العينة والكاشف الخاص بتحليل السكر .
- ✓ نمزج جيدا ونحضن لمدة 30 د في درجة حرارة المخبر أو 10 د في الدرجة 37 درجة مئوية .
- ✓ نضبط جهاز spectrophotometer على طول الموجة المناسب لتحليل السكر (nm500) ونقيس امتصاصية كل من المحلول العياري والعينة المرضية .

	Blank	Standard	Sample(serum)
Reagent R (ml)	1ml (1000µl)	1ml (1000µl)	1ml (1000µl)
Standard(µl)		10µl	
Sample(µl)			10µl

حساب تركيز السكر الدموي في العينة المرضية :

$$C_{Sample}\ (mg/dl) = A_{SAMPLE} / A_{STD} \times C_{STD}\ (mg/dl)$$

مناقشة النتيجة :

- ✓ القيمة الطبيعية لسكر الدم : 60-110 ملغ/دل
- ✓ أقل من 60ملغ/دل : يدل على نقص غلوكوز الدم Hypoglycemia
- ✓ أعلى من 110ملغ/دل : يدل على ارتفاع غلوكوز الدم hyperglycemia- diabetes millitues

الشحوم الثلاثية Triglycerides

الشحوم الثلاثية:

عبارة عن ثلاثة جزيئات من الحموض الدسمة مرتبطة بجزيئة غليسرول واحدة بروابط أسترية..

الوظيفة الأساسية لها تخزين الطاقة إمداد الجسم بها وقت الحاجة. عازل حراري ضد تبدلات الحرارية الشديدة، تساعد على حل وامتصاص الفيتامينات المنحلة بالدسم ....

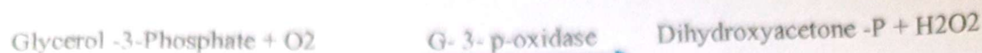
ترتفع قيمة Triglycerides في الداء السكري، قصور الدرق، الكحولية المزمنة، فرط شحوم الدم العائلي. تنخفض بشكل أساسي سوء التغذية ، وفقدان الوزن، بعض الأدوية.

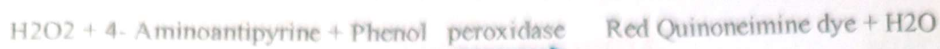
مبدأ المقايسة:

- يتم حلمهة الغليسيريدات الثلاثية الموجودة في العينة بواسطة أنزيم ليبوبروتين الليباز إلى غليسيرول وحموض دسمة حرة.
- ثم فسفرة الغليسيرول الناتج بوجود ATP وأنزيم غليسيرول كيناز ليعطي غليسيرول - 3 فوسفات.
- يتأكسد غليسيرول – 3 فوسفات الناتج بوجود أوكسجين الهواء وأنزيم غليسيرول -3 فوسفات أكسيداز ليعطي المركب ثنائي هيدروكسي أسيتون فوسفات والماء الأوكسجيني (بيروكسيد الهيدروجين).
- يتفاعل بيروكسيد الهيدروجين الناتج عن تفاعل السابق مع مركب 4 أمينو أنتي بيرين و الفينول بوجود أنزيم البيروكسيداز ليعطي معقداً ملوناً بلون أحمر زهري (كينون إيمين) والذي تتناسب شدة لونه مع تركيز ثلاثيات الغليسيريد الأصلي في العينة.









العينة :

مصل أو بلازما، تركيز ثابت في بلازما هيبارينية لمدة 5 أيام بالبراد، ويجب أن تكون العينة صيامية مدة 12-14 ساعة.

القسم العملي :

	Blank	Standard	Test
Reagent (L1)	1	1	1
Distilled water	0.01	-	-
Standard (S)	-	0.01	-
Sample	-	-	0.01

Mix well and incubate at 37C for 5 mins, or (25C) for 15mins, measure the absorbance of standard (Abs.S) and the Test sample (Abs.T) against the blank, within 60 mins.

Calculations:

Triglycerides in mg/dl = Abs.T / Abs S × 200

Expected Values: less than 150 mg/dl

تقييم الوظيفة الكبدية Assessment of the Hepatic Function

الألبومين Albumin

الألبومين هو بروتين كروي يتكون من 585 حمض أميني، ويعد البروتين الرئيسي في الدم، يشكل 60% من إجمالي بروتينات المصورة، يتم تركيبه في الكبد، شحنة سالبة، وزنه الجزيئي 65 ألف دالتون، يبلغ العمر النصفي له في المصورة 20 يوم.

تقدر قيمته الطبيعية بين 3.5 – 5.5 غ/دل.

وظائف الألبومين:

1. مسؤول عن plasma oncotic pressure 75-80% أي المحافظة على الضغط الأسموزي الغرواني للسوائل داخل الأنسجة، ويمنع تسريب الدم خارج الأوعية الدموية.
2. يعمل كناقل حيث يعد المسؤول عن نقل العديد من الشوارد والمركبات غير الذوابة بالماء مثل نقل الأدوية، الكالسيوم، الحديد، البيلروبين غير المباشر، الحموض الدسمة الحرة، هرمونات الغدة الدرقية .....
3. يعمل وقاء لتغيرات PH.

أسباب ارتفاعه:

يحدث بشكل أقل شيوعا من النقص، وبشكل أساسي في التجفاف.

أسباب انخفاضه:

- نقص في التصنيع:
  يحدث في أمراض الكبد (مثل التهاب الكبد، سرطان الكبد، تشمع الكبد).
  طفرات جسمية تسبب غياب الألبومين.
- زيادة إطراحه:
  أمراض الكلية: المتلازمة الكلائية (التناذر النفروني).
  خسارة عن طريق الجلد بسبب الحروق الشديدة، التهاب الجلد التقشري.
- سوء تغذية: مثل حالات المجاعة، وعلامة نقصه الأبرز هي الحبن، وذمات بالساقين وتحت العيون.
- سوء امتصاص: مثل أمراض التهاب الكولون التقرحي، داء كراون، داء الزلاقي.
- انخفاض كاذب: بسبب إعطاء كميات كبيرة من السوائل الوريدية، أو شرب كميات كبيرة من الماء.

يطلب اختبار الألبومين من أجل:

- ✓ اختبار وظائف الكبد والكلية.
- ✓ المساعدة في تحديد أسباب التورم في الكاحل (وذمة Edema)، أو في البطن (استسقاء أو حبن Ascites)، وجود سائل في الرئتين مترافق مع عسر تنفس (وذمة رئوية Pulmonary Edema).

مقايسة الألبومين:

المبدأ: يعتمد على ارتباط الألبومين مع أخضر بروموكريزول Bromocrysol Green بوسط حمضي متوسط PH= 4.2 مشكلاً معقد أخضر تقاس امتصاصيته عند طول الموجة 578 nm.

العينة : مصل أو بلازما مجموعة على هيبارين أو EDTA

طريقة العمل:

	Reagent blank	Sample or Standard
Sample / Standard	----	10µl
Reagent	1000µl	1000µl

Mix, incubate for 5min at 25°C, measure the absorbance of the sample and the standard against the blank within 30 min.

Calculation of the albumin Concentration:

$C_t = A_t / A_s \times 4$ g/dl

اختبارات وظائف الكبد (الأنزيمات الكبدية ALT, AST)

ويعتبر الكبد أهم عضو فيما يتعلق بالاستقلاب وإزالة السمية فهو يقوم بوظائف متعددة أساسية بالنسبة للحياة ويمكن تلخيص وظائف الكبد الأساسية كالتالي:

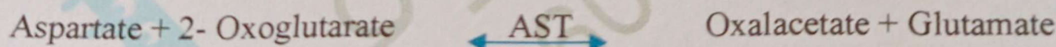
- **الوظيفة الإفرازية:** الخلايا الكبدية مسؤولة عن قبط، واقتران وإفراز البيليروبين، إضافة إلى ذلك فهناك إفراز البروتينات الشحمية.
- **الوظيفة الاستقلابية:** يلعب الكبد دوراً هاماً في التنظيم الاستقلابي للسكريات والبروتينات والدسم إضافة إلى عمليات خزنها، كما يقوم الكبد باصطناع عوامل التخثر، ويقوم باختزان الحديد والنحاس و الفيتامينات.
- **إزالة السمية:** يقوم الكبد بإزالة سمية الكثير من نواتج الاستقلاب والأدوية والذيفانات حيث أن إزالة السمية تبدأ بربط هذه المواد مع حمض الغلوكوروني والكبريتات والغليسين حيث تتضمن تفاعلات إزالة السمية عمليات الأكسدة والإرجاع والحلمهة.

الأنزيمات الكبدية الناقلة للأمين Aminotransferase Enzymes:

تعمل هذه الأنزيمات على نقل زمرة الأمين من حمض أميني إلى حمض كيتوني ألفا، ومن أهم ناقلات الأمين ناقلة أمين الأسبارتات والألانين (SGPT, SGOT) وهي تعمل بوجود Pyridoxal 5´phosphate (الشكل الفعال للفيتامين B6) الذي يلعب دور التميم الأنزيمي.

ناقلة أمين الأسبارتات Aspartate Amino Transferase (AST)
أو Glutamate Oxaloacetate Transminase (GOT)

يعمل هذا الأنزيم على نقل زمرة الأمين من حمض الاسبارتي إلى حمض ألفا أوكسو غلوتارات ولذلك يرمز له AST ويعطي أوكسالو أسيتات و غلوتامات.

Aspartate + 2- Oxoglutarate  AST Oxalacetate + Glutamate

- يتواجد هذا الأنزيم بشكل رئيسي في سيتوبلازما وميتوكوندريا الخلية الكبدية وعضلة القلب والكريات الحمراء والعضلات الهيكلية وفي الكلية كما يتواجد بفعالية ضئيلة في الطحال والبنكرياس والرئة.

ناقلة أمين الألانين ALT (Alanine Amino Transferase)
أو GPT (Glutamate Pyruvate Transaminase)

يعمل هذا الأنزيم على نقل زمرة الأمين من الألانين إلى أوكسوغلوتارات مشكلاً البيروفات و الغلوتامات.. يوجد هذا الأنزيم بشكل أساسي في الكبد ، وهو نوعي له.

- Alanine + 2-Oxoglutarate ALT Pyruvate + Glutamate



القيمة التشخيصية لكل من ALT-AST:

- ناقلات الأمين هذه تتواجد داخل الخلايا بصورة طبيعية لكن حدوث أذية أو اضطراب في نفوذية أغشية الخلايا الحاوية عليها سوف تحرر هذه الأنزيمات إلى الدم ويرتفع مستواها دالة على حالة مرضية معينة.
- ترتفع ALT,AST في كل الأمراض الكبدية (التهاب الكبد الفيروسي، تشمع الكبد، سرطان الكبد اليرقان.....)
- ALT أكثر نوعية للداء الكبدي من AST التي توجد في خلايا أخرى غير الكبد وخاصة الخلايا العضلية حيث ترتفع AST في احتشاء العضلة القلبية أكثر من ارتفاع ALT.
- تتراوح القيم الطبيعة لكل من AST,ALT في الدم بين 0-40 وحدة دولية / ليتر.

القسم العملي:

نعتمد على قياس فعالية الأنزيم بالطريقة الحركية Kinatic.

- يحدد التركيز التحفيزي من خلال معدل تناقص NADH و المقاس عند طول الموجه 340nm بواسطة تفاعل LDH (لاكتات دي هدروجيناز) أو MDH (مالات دي هدروجيناز).

- L-alanine + 2-Oxoglutarate ALT Pyruvate + L-glutamate



Pyruvate + NADH + H^+ LDH L-lactate + NAD^+



L-aspartate + 2- Oxoglutarate AST Oxalacetate + L-glutamate



Oxalacetate + NADH + H^+ MDH L-malate + NAD^+



العينة: مصل أو بلازما مجموعة على هيبارين أو EDTA، وتعد AST, ALT ثابتة في تلك العينات مدة ٧أيام في البراد.

Pipette into cuvettes	37° C
Sample	100µl
BUF	1000µl
Mix incubate for 5 min at 37°C	
SUB	250µl
Mix, read the absorbance after 1min (A0) and at the same time start the stop watch. Read the absorbance again exactly after 2 min (A2)	

U/L = (A2 – A0) /2 × factor

Factor = 1745

تقييم الوظيفة الكلوية Assessment of the Renal Function

اليوريا Blood Urea

تضم الكلية منطقتين القشرة Cortex واللب Medulla ويشكل النفرون الوحدة الوظيفية فيها حيث تضم كل كلية مليون نفرون.

تمتلك الكلية عدد من الوظائف الحيوية الهامة:

١. Excretory function الوظيفة الإطراحية: إنتاج وإطراح البول، إطراح نواتج الاستقلاب الغير مرغوب بها(اليوريا،الكرياتينين)، إطراح الأدوية والسموم .
٢. Regulatroy function الوظيفة التنظيمية: تنظيم توازن الماء (بالتالي ضغط الدم)، الشوارد، التوازن الحمضي القلوي.
٣. Endocrine function الوظيفة الهرمونية: الشكل النهائي الفعال للفيتامين D (25-1 دي هيدوكسي كولي كالسيفيرول)، الرينين، الإيريثروبيوتن.

وتضم الاختبارات المخبرية المستخدمة لتقييم الوظيفة الكلوية العديد من التحاليل منها:

- البولة Urea
- الكرياتينين Creatinine

أولاً: <u>البولة</u> هي الناتج النهائي لاستقلاب البروتينات بالجسم، يتم اصطناع البولة بالكبد (البروتينات تتحطم إلى حموض أمينية والتي يتم نزع الزمرة الأمينية منها لتشكل أمونيا، وهي مركب سام يتم تحويله في الكبد إلى يوريا عن طريق مجموعة من تفاعلات تسمى Urea cycle) ثم تنتقل إلى الدم ليتم إطراحها عن طريق الكلية .

<u>أسباب انخفاض اليوريا:</u>

الحمية منخفضة البروتين.

الأذية الكبدية الشديدة.

حالات الحمل وعند الأطفال نظرا لضرورة اصطناع البروتين.

فرط الإماهة.

<u>أسباب ارتفاع اليوريا:</u>

الحمية عالية البروتين.

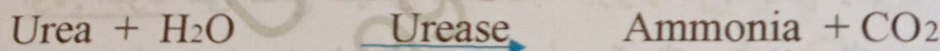
زيادة استقلاب البروتين (شدة، أورام).

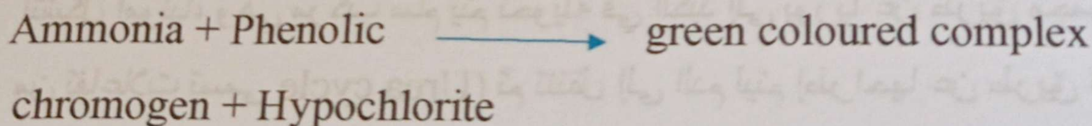
نقص الإماهة.

الفشل الكلوي .

مقايسة اليوريا:

<u>مبدأ التحليل</u>: يقوم أنزيم اليورياز بتفكيك اليوريا وإعطاء الأمونيا وثاني أكسيد الكربون، التي تتفاعل بدورها مع كروموجين فينولي وهيبوكلوريد الصوديوم ويتشكل معقد أخضر اللون تقاس امتصاصيته عند طول الموجة 570nm، وتتناسب شدة اللون المتكون مع تركيز اليوريا بالعينة.





العينة المستخدمة: مصل أو بلازما مجموعة على الهيبارين، ويفضل عدم استخدام السيترات أو الفلورايد لأنها تثبط أنزيم اليورياز، لاتستعمل العينات المنحلة.

Addition Sequence	B (ml)	S (ml)	T (ml)
Buffer reagent (L1)	1	1	1
Enzyme reagent (L2)	0.1	0.1	0.1
Distilled water	0.01	-	-
Urea Standard (S)	-	0.01	-
Sample	-	-	0.01
Mix well and incubate for 5min at37° C or 10min at 25°C			
Chromogen reagent (L3)	0.2	0.2	0.2

Mix well and incubate for 5min at37° C or 10min at 25°C, Measure the absorbance of the standard and test against the blank with 60min.

Calculations:

Urea in mg/dl = Abs.T/ Abs.S × 40

Urea Nitrogen in mg/dl = Urea in mg/dl × 0.467

Reference range = 20 - 40 mg/dl